大鼠胰岛甲硫氨酸脑啡肽免疫细胞化学的阳性显示

刘胜洪　张亦农　李肇春　刘子龙　肖道恒　王庆堂

（同济医科大学　武汉）

摘　要

本实验用免疫细胞化学 PAP 法和高度敏感的免疫金银法，对大鼠胰腺石蜡切片，用相邻切片比较法，进行免疫细胞化学反应，发现在大鼠胰岛A细胞内，呈现出甲硫氨酸脑啡肽的阳性免疫反应。根据文献报道，胰岛内分泌细胞中还有几种其它的调节肽类的物质存在，可以推测，胰岛内分泌功能受较复杂的神经体液（包括旁分泌和自分泌）调节机制的影响。文中对甲硫氨酸脑啡肽与其它神经肽类物质在胰岛A细胞中共存的意义也进行了讨论。

关键词：胰岛A细胞，甲硫氨酸脑啡肽，免疫细胞化学

组织学将胰岛内分泌细胞按分泌激素种类分为A，B，D，PP等细胞，它们可分别释放胰高血糖素（GLU）；胰岛素（INS）；生长抑素（SOM）；胰多肽（PP）等。血糖水平和植物神经则对这些内分泌细胞的功能活动进行调节。

近年来，随着免疫细胞化学的发展，先后有实验证实，胰岛内分泌细胞中，除含上述激素外，还会有β-内啡肽（Grube等），脑啡肽（Feurle等），强啡肽（Cetin等），P物质（Rombout等），由此看来，胰岛内分泌细胞中确实存在一些与神经系统中的调节递质相同的物质。

本实验用免疫细胞化学PAP法和免疫金银法，在研究大鼠胰岛内分泌细胞构筑时，发现胰岛A细胞呈甲硫氨酸脑啡肽（M-ENK）阳性反应。对此，本文进行了分析讨论。

材 料 和 方 法

一、动物及取材：

Wistar大白鼠4只，在3％戊巴比妥麻醉下，剖腹取胰尾组织，在Bouin固定液中剪成小块后，固定4小时。继之，脱水，透明，石蜡包埋。5μ连续切片，分别编号粘贴在涂有铬矾明胶的载玻片上。48℃温箱放置过夜。

本文1988年9月26日收到，1989年2月9日修回。

二、试剂：

兔抗甲硫酸脑啡肽抗血清（Anti-M-ENK）系Immunonuclear公司产；兔抗胰高血糖素抗血清（Anti-GLU）系Amersham公司产；羊抗兔IgG，中国医科院基础医学研究所免疫室提供；过氧化物酶—兔抗过氧化物酶复合体（PAP）由同济医大附属同济医院提供。葡萄球菌A蛋白（PA），上海生物制品所产。金标PA为本组1987年12月制备。M-ENK纯抗原：Sigma公司产。正常兔血清由本室戴晓莉老师提供。

三、免疫细胞化学（简称ICC）染色反应步骤：

1.PAP法：①切片脱蜡至水。②3%H_2O_2 10分钟。③含0.2%Triton X—100的0.1M PBS漂洗10分钟。④0.01M PBS稀释的1%正常小牛血清封闭10分钟。⑤一抗孵育（稀释度见实验分组）4°C，48小时后，室温2小时。⑥PBS漂洗5分钟，换3次，用羊抗兔IgG（1：40）孵育，32°C，45分钟。⑦同前PBS漂洗后，入1:40PAP，32°C，45分钟。⑧PBS漂洗后，入0.05%DAB（TBS稀释）进行显色反应，15—25分钟，阳性反应出现后，TBS洗去DAB。然后，脱水，透明，树胶封片。

2.免疫金银法：步骤①②③⑤同上。④⑥用TBS漂洗5分钟，换3次后，分别用1%和10%TBS稀释的卵清蛋白封闭10分钟。⑦入1:10金标PA（15nm），室温2小时。⑧先后用TBS和双蒸水漂洗后，按王保乐银加强法进行增强染色，蒸水洗净后，脱水，透明，树胶封片。

四、实验分组：

1.实验组：A）用Anti-M-ENK抗血清分四个稀释度组（1：1000；1：1500；1:2000；1:2500）对切片进行ICC染色，B）取与上述切片相邻的切片，用Anti-GLU抗血清对其进行ICC染色。

2.阴性对照组：将正常兔血清分为四个稀释度组（1:500；1:1000；1:1500；1:2000）对切片进行ICC染色。

3.中和对照组：用纯M-ENK抗原以每毫升100μg的M-ENK对上述各稀释度Anti-M-ENK抗血清进行中和，过夜，离心后取上清液对切片进行ICC染色。

结 果

用四种不同稀释度Anti-M-ENK抗血清对4只大鼠胰腺石蜡切片进行ICC染色后，均在胰岛周边显示出数量较多，环胰岛排列的阳性细胞，取与之相邻的经过Anti-GLU抗血清处理的ICC染色的切片进行对比，上述两种抗血清的反应都发生在同一种细胞——即胰岛A细胞内（见图1，图2）。

在PAP反应强度方面，用Anti-M-ENK抗血清显示的切片明显较Anti-GLU血清显示的结果弱，提示A细胞中两种物质的含量有一定差距。为了提高Anti-M-ENK的ICC染色的阳性显示效果，我们采用了免疫金银法。与PAP法相比，用该法显示的结果更为令人满意。

用四个不同稀释度的正常兔血清进行的替代一抗的对照切片上，我们发现除1：500浓度组切片胰岛A细胞呈弱阳性反应外，其余三组切片均呈阴性反应。这与Grube等报

道的现象相似。说明在进行胰岛细胞 ICC显示时，必须用高稀释度抗血清来回避这种假阳性反应的结果发生。

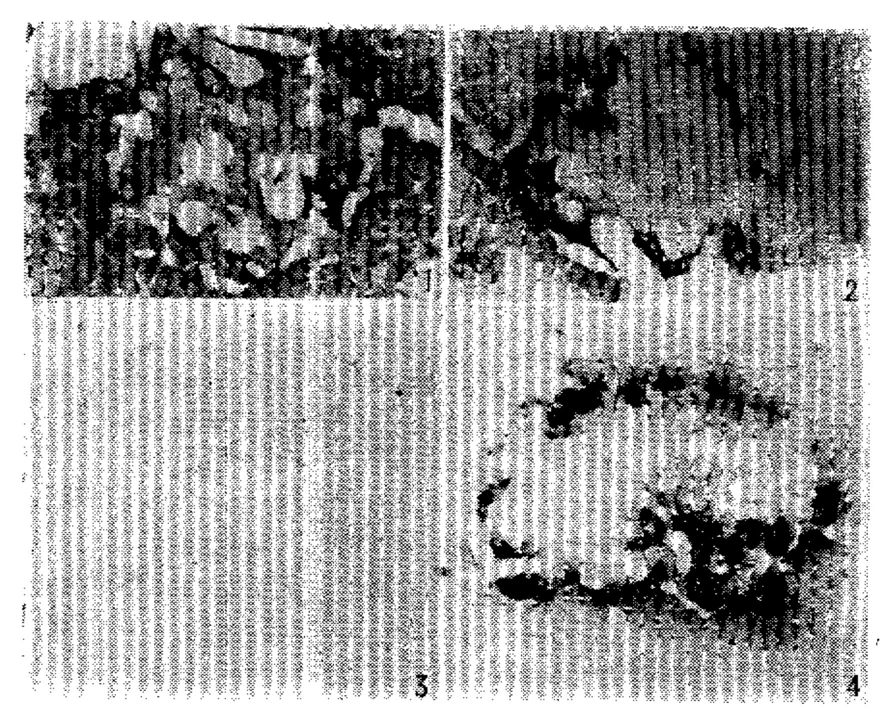


图 1—4　说明：

大鼠胰岛甲硫氨酸脑啡肽（M-ENK）和胰高血糖素（GLU）的免疫细胞化学染色。对相邻胰腺石蜡切片（5μ）用免疫金银法显示M-ENK（图 1），GLU（图 2）；用PAP法显示M-ENK（图 3），GLU（图 4）。倍数 600×，图片结果说明两种抗血清的免疫细胞化学反应在相邻切片上显示的是相同细胞，皆属胰岛A细胞。

中和对照组用纯M-ENK对Anti-M-ENK抗血清进行中和后，所进行的 ICC 染色的切片中，胰岛A细胞呈阴性反应结果。说明该抗血清对M-ENK 有高度免疫活性。

讨　论

用Anti-M-ENK和Anti-GLU两种抗血清对 4 只大鼠胰腺切片进行 ICC 染色，两种方法（PAP 法，免疫金银法）均能在胰岛A细胞显示 M-ENK 的阳性反应。对此，我们认为有如下问题值得讨论。

1．因文献提出胰岛A细胞具有一定的非特异性结合能力，在使用1：600左右正常兔血清处理的 ICC染色切片中会出现假阳性结果。本实验用正常兔血清替代一抗处理对照切片的结果也说明了这一点。为此，我们采用提高一抗稀释度的办法，来显示反应的特异性。经过使用1：2500稀释的 Anti-M-ENK 抗血清孵育的切片，仍显 ICC反应

阳性，而在1：1000以上正常兔血清处理ICC反应切片中，假阳性反应消失，说明关于非特异性结合的问题可能被排除。

2.交叉反应问题：因有人报道，胰岛A细胞内有 β-内啡肽和强啡肽存在，而这两种肽类物质与脑啡肽都有相似之处，它们之间是否存在交叉反应问题应该予以重视。但艾民康，赵轶千等根据实验资料分析，得出结论，尽管 M-ENK 与β-内啡肽的部分片段序列相同，但彼此间并不存在交叉反应，或交叉反应甚微弱。

另外，强啡肽的三种亚型虽然都具有与脑啡肽相同序列的片段，但 Cetin 等1983年做胰岛免疫细胞化学实验前对多种抗血清的中和试验结果表明，Anti-M-ENK 抗血清不能够识别强啡肽，反之亦然。

3. Timmers等对胰岛 M-ENK 进行定量观察的同时，用 PAP 法，又在胰岛β细胞内观察到 M-ENK 的阳性反应。因此他认为胰岛中的 ENK 物质与胰岛素共存于β细胞内。

本实验用高稀释度抗血清，在4只大鼠胰腺石蜡切片上，用两种不同的免疫细胞化学方法，在胰岛A细胞内均显示出M-ENK的阳性反应。这种与 Timmers 等人报道的结果不同的原因，还有待于进一步探讨。

近年来，先后有文献报道，在胰岛A细胞内有 β-内啡肽，强啡肽，本实验发现大鼠胰岛A细胞内存在 M-ENK 的阳性免疫细胞化学反应。对这些物质共存的现象还不能很好解释。1981年， Teitelman 等提出小鼠胰高血糖素细胞可能是由多巴胺能神经元转变而来，这为A细胞内神经递质的共存现象，从发生学上提供了一些可以解释的依据。

至于大鼠胰岛A细胞内 M-ENK 存在的功能意义，目前尚不清楚。鉴于胰岛在发生学和分泌功能上都不是一个简单的器官，其内分泌细胞之间又存在较多的缝隙连接，因此推测，A细胞内的 M-ENK 和其它神经肽样物质可能参入胰岛的内分泌功能的调节，而且很可能在旁分泌或自分泌调节机制中起重要作用。我们将对这一推测开展进一步实验研究。

参 考 文 献

艾民康等 1987 神经介质及有关酶类的组织化学。人民卫生出版社。

Cetin, Y. 1985 Immunohistochemistry of β-endophin in the endocrine pancreas of rat and man. *Histochemistry*. 83(4):369—373.

Feurle, G.E. *et al.* 1982 Met-and Leu-enkephalin immuno-and bio-reactivity in human stomach and pancreas. *Life science*. 31:2961—2969.

Grube, D. *et al.* 1978 Pancreas glucagon cells contain endophin-like immunoreactivity. *Histochemistry*. 59:75—79.

Rombout, J.H.M. and Reinecke, M. 1984 Immunohistochemical localization of (neuro) peptide hormones in endocrine cell and nerves of the gut of a stomachless teleosst fish, Barbus conchonius (Cyprinidae). *Cell and Tissue Research*. 237:57—65.

Teitelman, G. *et al.* 1981 Transformation of catecholaminergic precursors into glucagon (A) cell in mouse embryonic pancreas. *Proceeding of the national academy of science U.S.A.* 78(8):5225.

Timmers, K.I. *et al.* 1986 Opioid peptides in rat islet of Langerhans. *Diabetes*. 35(1):52—57.

THE POSITIVE IMMUNOCYTOCHEMICAL REACTION OF MET-ENKEPHALIN IN LANGERHAN ISLET OF RAT

Liu Shenghong　Zhang Yilong　Li Zhaochun
Liu Zilong　Xiao Daoheng　Wang Qinglang
(Tongji Medical University, Wuhan)

Neighboring paraffin sections of pancreas of rat were performed with immunocytochemistry (PAP method and protein A gold-silver method). It was found that positive immunocytochemical reaction of Met-enkephalin and glucagon appeared in the same cells (i.e. A cell) of endocrine pancreas after a series of test for specificity of the reaction. According to some works reported previously, some other regulative neuropeptides exist in endocrine pancreas too, it could be concluded that the function of islet may be affected by a complicated neuro-humoral regulative system (including paracrine and autocrine regulation). The meaning of the coexistance of Met-enkephalin with other neuropeptides in the glucagon cell of Langerhan islet were discussed.

Key words: A cell of islet, Met-enkephalin, Immunocytochemistry